



## IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicant : Takao NAKAMURA et al.  
 Serial No. : 09/963,766  
 Filed : September 25, 2001  
 Title : NOVEL GUANOSINE TRIPHOSPHATE (GTP) BINDING PROTEIN-TECH CENTER 1600/29  
 COUPLED RECEPTOR PROTEIN, BG3

Art Unit : 1645  
 Examiner : Unknown

RECEIVED

FEB 07 2002

Commissioner for Patents  
 Washington, D.C. 20231

TRANSMITTAL OF PRIORITY DOCUMENT UNDER 35 USC §119

Applicants hereby confirm their claim of priority under 35 USC §119 from the following application(s):

Japan Application No. 11/82641 filed March 25, 1999

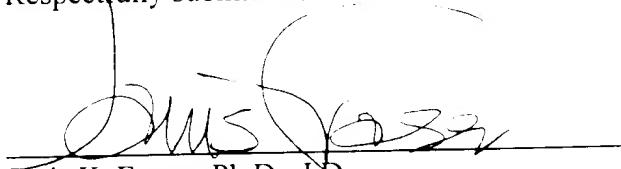
A certified copy of each application from which priority is claimed is submitted herewith.

Please apply any charges or credits to Deposit Account No. 06-1050.

Respectfully submitted,

Date:

Dec. 28, 2001

  
 Janis K. Fraser, Ph.D., J.D.  
 Reg. No. 34,819

Fish & Richardson P.C.  
 225 Franklin Street  
 Boston, Massachusetts 02110-2804  
 Telephone: (617) 542-5070  
 Facsimile: (617) 542-8906

20365088 doc

## CERTIFICATE OF MAILING BY FIRST CLASS MAIL

I hereby certify under 37 CFR §1.8(a) that this correspondence is being deposited with the United States Postal Service as first class mail with sufficient postage on the date indicated below and is addressed to the Commissioner for Patents, Washington, D.C. 20231

Date of Deposit



Typed or Printed Name of Person Signing Certificate



RECEIVED

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

FEB 07 2002

TECH CENTER 1600 2900

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて  
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed  
with this Office

出願年月日

Date of Application: 1999年 3月 25日

出願番号

Application Number: 平成 11 年特許願第 082641 号

出願人

Applicant(s): 萬有製薬株式会社

2001年11月30日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

及川耕造

出証番号 出証特 2001-3105463

【書類名】 特許願  
【整理番号】 B1-101  
【提出日】 平成11年 3月25日  
【あて先】 特許庁長官殿  
【国際特許分類】 C12N 15/12  
【発明者】  
【住所又は居所】 茨城県つくば市大久保3番地 萬有製薬株式会社つくば  
研究所内  
【氏名】 中村 隆男  
【発明者】  
【住所又は居所】 茨城県つくば市大久保3番地 萬有製薬株式会社つくば  
研究所内  
【氏名】 太田 雅貴  
【特許出願人】  
【識別番号】 000005072  
【氏名又は名称】 萬有製薬株式会社  
【代理人】  
【識別番号】 100102978  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 清水 初志  
【選任した代理人】  
【識別番号】 100108774  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 橋本 一憲  
【手数料の表示】  
【予納台帳番号】 041092  
【納付金額】 21,000円  
【提出物件の目録】  
【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 新規なグアノシン三リン酸（GTP）結合タンパク質共役型のレセプタータンパク質、BG3

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号：6に記載のアミノ酸配列または該アミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/もしくは付加したアミノ酸配列を有する、グアノシン三リン酸結合タンパク質共役型のレセプタータンパク質。

【請求項2】 配列番号：5に記載の塩基配列からなるDNAにハイブリダイズするDNAがコードする、グアノシン三リン酸結合タンパク質共役型のレセプタータンパク質。

【請求項3】 請求項1または2に記載のレセプタータンパク質の部分ペプチド。

【請求項4】 請求項1または2に記載のレセプタータンパク質または請求項3に記載の部分ペプチドをコードするDNA。

【請求項5】 配列番号：5に記載の塩基配列のコード領域を含む、請求項4に記載のDNA。

【請求項6】 請求項4または5に記載のDNAを含有することを特徴とするベクター。

【請求項7】 請求項6に記載のベクターを保持する形質転換体。

【請求項8】 請求項7記載の形質転換体を培養する工程を含む、請求項1または2に記載のレセプタータンパク質または請求項3に記載の部分ペプチドの製造方法。

【請求項9】 請求項1または2に記載のレセプタータンパク質に結合するリガンドのスクリーニング方法であって、

(a) 請求項1または2に記載のレセプタータンパク質または請求項3に記載の部分ペプチドに被検化合物を接触させる工程、

(b)、該タンパク質または部分ペプチドに結合する化合物を選択する工程、を含む方法。

【請求項10】 請求項1または2に記載のレセプタータンパク質とそのリガンドとの結合を阻害する活性を有する化合物のスクリーニング方法であって、

(a) 被検化合物の存在下で請求項1または2に記載のレセプタータンパク質または請求項3に記載の部分ペプチドにリガンドを接触させ、該タンパク質もしくはその部分ペプチドとリガンドとの結合活性を検出する工程、

(b) 工程(a)で検出された結合活性を、被検化合物非存在下での結合活性と比較し、該タンパク質または部分ペプチドとリガンドとの結合活性を低下させる化合物を選択する工程、を含む方法。

【請求項11】 請求項1または2に記載のレセプタータンパク質または請求項3に記載の部分ペプチドを含有することを特徴とする、請求項1または2に記載のレセプタータンパク質とそのリガンドとの結合を阻害する化合物のスクリーニング用キット。

【請求項12】 請求項1または2に記載のレセプタータンパク質または請求項3に記載の部分ペプチドに結合する抗体。

【請求項13】 配列番号：5に記載の塩基配列からなるDNAと特異的にハイブリダイズし、少なくとも15塩基の鎖長を有するDNA。

#### 【発明の詳細な説明】

##### 【0001】

##### 【発明の属する技術分野】

本発明は、複数種の組織で発現する新規なGタンパク質共役型のレセプタータンパク質、該タンパク質をコードするDNAを含有するDNA、該Gタンパク質共役型のレセプタータンパク質の製造方法、ならびに該タンパク質およびDNAの用途に関する。

##### 【0002】

##### 【従来の技術】

Gタンパク質共役型のレセプター（グアノシン三リン酸結合タンパク質共役型レセプター）は哺乳類において広く存在し、生物学的にも重要な機能を担っていると考えられる。

##### 【0003】

代表的な視床下部ホルモンとして、TRH、CRF、GRF、ソマトスタチン、また下垂体ホルモンとして、TSH、ACTH、FSH、LH、プロラクチン、成長ホルモン、オキシトシン、バソプレッシンなどがある。特に、下垂体ホルモンは視床下部ホルモンと標的内分泌腺より分泌される末梢ホルモンによるポジティブあるいは、ネガティブなフィードバック機構によって分泌調節されている。

## 【0008】

これらのホルモンおよびそのレセプターは単に、視床下部一下垂体系だけに局在しているのではなく、脳内にも広く分布することが知られている。また、末梢組織においても同様に分布し、それぞれ重要な機能を担っていると考えられている。

## 【0009】

例えば、脾臓は消化液を分泌する他にグルカゴンやインスリンを分泌することにより糖代謝に重要な役割を果たしている。インスリンは脾臓の $\beta$ 細胞から分泌されるが、主としてグルコースにより促進される。しかし $\beta$ 細胞には様々なレセプターが存在し、グルコース以外の様々な因子、ペプチドホルモン（ガラニン、ソマトスタチン、ガストリン、セクレチン、ガストリック・インヒビトリーゼ・ペプチド、グルカゴンなど）、糖（マンノースなど）、アミノ酸、神経伝達物質などにより、インスリンの分泌が制御されていることが知られている。

## 【0010】

胃や小腸などの消化器官では、ガストリン、セクレチン、グルカゴン、ガストリン放出ペプチド、血管作動性小腸ペプチド、アセチルコリン、ノルアドレナリン、およびセロトニン等といった、多くのホルモン・ホルモン様物質・神経伝達物質あるいは生理活性物質などによる調節のもとで、種々の消化液が分泌され、食物の消化・吸収が行われている。これらの物質は、胃や小腸などに存在する、それぞれに対応するレセプターによってその分泌が制御されていると考えられている。

## 【0011】

心臓、肺をはじめとする、心臓血管系、呼吸器系においても、神経伝達物質、ホルモンあるいは生理活性物質などによる調節のもとで、心筋、血管平滑筋の

収縮及び、弛緩、血圧の調節などが厳密におこなわれている。

【0012】

以上のように脳、下垂体をはじめ、末梢組織においても、様々なホルモンや神経伝達物質に対するレセプタータンパク質が存在し、その機能調節に重要な役割を果たしていると考えられる。

【0013】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、新規なGタンパク質共役型のレセプタータンパク質、該タンパク質をコードするDNAを含有するDNA、該Gタンパク質共役型レセプタータンパク質の製造方法、および該タンパク質ならびにDNAの用途を提供することを課題とする。

【0014】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、新規なGタンパク質共役型レセプタータンパク質をコードするDNAを単離するために、Gタンパク質共役型レセプタータンパク質の膜貫通領域に特異的なプローブを用いたヒト胎児全脳由来cDNAライブラリーのスクリーニングをBiotin-Avidin capture法に基づいて行った。その結果、本発明者らは、既知のGタンパク質共役型レセプタータンパク質とアミノ酸配列の部分的な相同性を有するタンパク質をコードする新たなcDNA断片を取得した。さらに取得したcDNA断片に基づいて調製したプローブを用いてヒト心臓由来のcDNAライブラリーについてスクリーニングを行い、完全長の翻訳枠（オープンリーディングフレーム）を持つcDNA（「BG3」と称する）を単離することに成功した。

【0015】

ヒト組織由来のRNAを用いたノーザンハイブリダイゼーションにより、これらの遺伝子の発現を解析したところ、「BG3」はさまざまな組織で発現が見られ、特に心臓、胎盤、および肺において強い発現が見られた。また、ヒト「BG3」をプローブに用いたサザンハイブリダイゼーションにより、広範囲の哺乳動物のゲノムDNAでシグナルが検出されたことから、「BG3」は哺乳動物に高度に保存された、重要な機能を有する遺伝子であることが示唆される。

## 【0016】

新規なGタンパク質共役型レセプタータンパク質である「BG3」は、既知のGタンパク質共役型レセプタータンパク質と比べると比較的大きいタンパク質であり、カルシトニンレセプター、上皮小体ホルモン(PTH)レセプター、グルカゴンレセプターなどに代表されるClass Bに分類されるレセプターファミリー群に対し、タンパク質の膜貫通領域において、24~30%の同一性および38~50%程度の類似性を示す。また、N端側の細胞外領域においては、既知のタンパク質と相同性を示さない。前述した $\alpha$ -Latrotoxin受容体は、本発明の「BG3」タンパク質と比較的高いアミノ酸配列上の相同性を示すタンパク質の1つである。本発明者らにより見出された「BG3」レセプタータンパク質は、神経伝達物質分泌を含む、広く生体調節に関わるホルモン分泌に関与するレセプターであると考えられる。

## 【0017】

「BG3」タンパク質は、その結合活性や細胞刺激活性を指標として、そのリガンドのスクリーニングに、また、これらタンパク質からのシグナル伝達を調節する医薬品候補化合物のスクリーニングに好適に用いることができる。

## 【0018】

従って、本発明は新規なGタンパク質共役型のレセプタータンパク質、これらタンパク質をコードするDNA、およびこれらタンパク質を利用したリガンドおよび医薬品候補化合物のスクリーニングに関し、より具体的には、

(1) 配列番号：6に記載のアミノ酸配列または該アミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/もしくは付加したアミノ酸配列を有する、グアノシン三リン酸結合タンパク質共役型のレセプタータンパク質、

(2) 配列番号：5に記載の塩基配列からなるDNAにハイブリダイズするDNAがコードする、グアノシン三リン酸結合タンパク質共役型のレセプタータンパク質、

(3) (1)または(2)に記載のレセプタータンパク質の部分ペプチド、

(4) (1)または(2)に記載のレセプタータンパク質または(3)に記載

の部分ペプチドをコードするDNA、

(5) 配列番号：5に記載の塩基配列のコード領域を含む、(4)に記載のDNA、

(6) (4)または(5)に記載のDNAを含有することを特徴とするベクター、

(7) (6)に記載のベクターを保持する形質転換体、

(8) (7)記載の形質転換体を培養する工程を含む、(1)または(2)に記載のレセプタータンパク質または(3)に記載の部分ペプチドの製造方法、

(9) (1)または(2)に記載のレセプタータンパク質に結合するリガンドのスクリーニング方法であって、

(a) (1)または(2)に記載のレセプタータンパク質または(3)に記載の部分ペプチドに被検化合物を接触させる工程、

(b) 該タンパク質または部分ペプチドに結合する化合物を選択する工程、を含む方法、

(10) (1)または(2)に記載のレセプタータンパク質とそのリガンドとの結合を阻害する活性を有する化合物のスクリーニング方法であって、

(a) 被検化合物の存在下で(1)または(2)に記載のレセプタータンパク質または(3)に記載の部分ペプチドにリガンドを接触させ、該タンパク質もしくはその部分ペプチドとリガンドとの結合活性を検出する工程、

(b) 工程(a)で検出された結合活性を、被検化合物非存在下での結合活性と比較し、該タンパク質または部分ペプチドとリガンドとの結合活性を低下させる化合物を選択する工程、を含む方法、

(11) (1)または(2)に記載のレセプタータンパク質または(3)に記載の部分ペプチドを含有することを特徴とする、(1)または(2)に記載のレセプタータンパク質とそのリガンドとの結合を阻害する化合物のスクリーニング用キット、

(12) (1)または(2)に記載のレセプタータンパク質または(3)に記載の部分ペプチドに結合する抗体、

(13) 配列番号：5に記載の塩基配列からなるDNAと特異的にハイブリダ

イズし、少なくとも15塩基の鎖長を有するDNA、  
に関する。

## 【0019】

なお、本発明において「Gタンパク質共役型のレセプタータンパク質」とは、Gタンパク質の活性化を通じて細胞内のシグナル伝達を行なっているレセプタータンパク質を指す。また、本発明において「リガンド」とは、Gタンパク質共役型のレセプタータンパク質に結合して、シグナル伝達を誘導する能力を有する天然の化合物を指す。また、本発明において「アゴニスト」とは、Gタンパク質共役型レセプタータンパク質のリガンドと同様の生理活性を有する化合物を指し、天然の化合物および人工的に合成された化合物の双方が含まれる。また、本発明において「アンタゴニスト」とは、Gタンパク質共役型レセプタータンパク質のリガンドの生理活性を抑制する能力を有する化合物を指し、天然の化合物および人工的に合成された化合物の双方が含まれる。また、本発明における「タンパク質」および「ペプチド」にはその塩も含まれる。

## 【0020】

## 【発明の実施の形態】

本発明は、新規なGタンパク質共役型のレセプタータンパク質に関する。本発明者等により単離されたヒト由来のGタンパク質共役型レセプタータンパク質「BG3」のcDNAの塩基配列を配列番号：5に、該cDNAによりコードされる「BG3」タンパク質のアミノ酸配列を配列番号：6に示す。

## 【0021】

「BG3」タンパク質をコードする遺伝子は、F<sub>g</sub>プローブを用いたBiotin-Avidin capture法により、ヒト胎児脳由来のcDNAライブラリーから単離された。

## 【0022】

本発明のヒト「BG3」タンパク質は874アミノ酸残基のタンパク質をコードするオープンリーディングフレームを含有する。疎水性プロット解析の結果、「BG3」タンパク質はGタンパク質共役型レセプタータンパク質に特徴的な7つの疎水性ドメインを有していた(図1)。

## 【0023】

「BG3」タンパク質はラットCa<sup>++</sup>非依存性 $\alpha$ -Latrotoxin受容体に相同意を示し、328アミノ酸鎖長にわたって38%の同一性および56%の類似性を示す。「BG3」タンパク質は、また、いくつかのコルチコトロピン放出ファクターレセプター(CRF-R)に対して269アミノ酸鎖長にわたって27%の同一性および49%の類似性を示す。

## 【0024】

ヒト組織において「BG3」タンパク質によりコードされるレセプターmRNAの発現は、検定した全組織（心臓、脳、胎盤、肺、肝臓、骨格筋、腎臓、脾臓）においてシグナルが検出された。これらの組織のうち、心臓、胎盤および肺において特に強いシグナルが検出された。

## 【0025】

これらの事実は、「BG3」タンパク質が、Gタンパク質共役型レセプタータンパク質ファミリーに属することを示している。そして、「BG3」タンパク質がGタンパク質共役型レセプタータンパク質であることは、そのリガンドの作用によりGタンパク質の活性化を通じてシグナル伝達を行っていることを示している。

## 【0026】

「BG3」レセプタータンパク質の内因性のリガンドは同定されていない。本発明のタンパク質は、医薬品として有用なりガンドのスクリーニングや、該リガンドとの結合を阻害する化合物のスクリーニングに利用することが可能である。

## 【0027】

本発明のレセプタータンパク質に対する潜在的リガンドは、PTH（上皮小体ホルモン）、カルシトニン、CGRP（カルシトニン遺伝子関連タンパク質）、グルカゴン、セクレチン、アドレノメジュリン、セロトニン、アドレナリンおよびノルアドレナリン、ガラニン、ソマトスタチン、およびケモカインを包含するが、これに限定されない。

## 【0028】

本発明のタンパク質を介するシグナル伝達の異常は、種々の疾患の原因となり得ると考えられる。したがって、本発明のGタンパク質共役型レセプターを活性化する化合物や、該Gタンパク質共役型レセプターの機能を抑制できる化合物は

、医薬品としての応用が期待される。本発明のGタンパク質共役型レセプターを活性化する化合物を疾患の治療や予防目的に用いる場合に対象となる疾患としては、例えば、喘息、パーキンソン病、急性心不全、慢性心不全、先天性心疾患、糖尿病、腎不全、癌、癌転移、低血圧（または高血圧）尿停留、および骨粗しよう症などが考えられる。

## 【0029】

また、本発明のGタンパク質共役型レセプターの活性化を抑制する化合物を治療や予防目的に用いる場合に対象となる疾患としては、例えば、高血圧（または低血圧）、狭心症、心筋梗塞、脳梗塞、糖尿病、腎不全、癌、潰瘍、喘息、アレルギー、良性前立腺肥大および分裂症、躁病興奮、鬱、譫妄、痴呆または重度の精神薄弱を含む精神病的および神経学的障害、ハンチントン病またはジルドラトウーレット症候群などの運動異常が考えられる。Gタンパク質共役型レセプターを抑制する化合物は、また、内因的食欲不振の反転および病的飢餓の調整に有用である可能性が考えられる。

## 【0030】

本発明のタンパク質は、天然のタンパク質の他、遺伝子組み換え技術を利用した組換えタンパク質として調製することができる。天然のタンパク質は、例えば、「BG3」タンパク質が発現していると考えられる組織（例えば心臓、胎盤、および肺）の抽出液に対し、後述する「BG3」タンパク質に対する抗体を用いたアフィニティクロマトグラフィーを行う方法により調製することが可能である。一方、組換えタンパク質は、後述するように「BG3」タンパク質をコードするDNAで形質転換した細胞を培養し、これらタンパク質を発現させ回収することにより調製することが可能である。

## 【0031】

また、当業者であれば、公知の方法を用いて天然型のヒト「BG3」タンパク質（「BG3」のアミノ酸配列を配列番号：6に示す）中のアミノ酸の置換などの修飾を行い、天然型のタンパク質と同等の機能（グアノシン三リン酸結合タンパク質の活性化を通じて細胞内のシグナル伝達を行なう機能）を有する改変タンパク質を調製することが可能である。また、タンパク質のアミノ酸の変異は天然にお

いても生じうる。このようにアミノ酸の置換、欠失、付加、挿入などにより天然型のタンパク質に対してアミノ酸配列が変異した変異体であって、天然型のタンパク質と同等の機能を有するタンパク質も本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質に含まれる。

## 【0032】

置換されるアミノ酸は、置換前のアミノ酸と似た性質を有するアミノ酸であることが好ましい。例えば、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Met、Phe、Trpは、共に非極性アミノ酸に分類されるため、互いに似た性質を有すると考えられる。また、非荷電性としては、Gly、Ser、Thr、Cys、Tyr、Asn、Glnが挙げられる。また、酸性アミノ酸としては、AspおよびGluが挙げられる。また、塩基性アミノ酸としては、Lys、Arg、Hisが挙げられる。

## 【0033】

当業者に公知のアミノ酸を改変する方法としては、例えば、Kunkel法 (Kunkel, T. A. et al., *Methods Enzymol.* 154, 367-382 (1987))、ダブルプライマー法 (Zoller, M. J. and Smith, M., *Methods Enzymol.* 154, 329-350 (1987))、カセット変異法 (Wells, et al., *Gene* 34, 315-23 (1985))、メガプライマー法 (Sarkar, G. and Sommer, S. S., *Biotechniques* 8, 404-407 (1990)) が挙げられる。機能的に同等なタンパク質におけるアミノ酸の変異数は、通常、全アミノ酸の10%以内、好ましくは10アミノ酸以内、さらに好ましくは3アミノ酸以内（例えば、1アミノ酸）である。

## 【0034】

また、当業者にとってはハイブリダイゼーション技術 (Hanahan, D. and Meselson, M., *Meth. Enzymol.* 100, 333-342 (1983)、Benton, W. D. and Davis, R. W., *Science* 196, 180-182 (1977))などを用いて、ヒト「BG3」cDNA配列（ヒト「BG3」の塩基配列を配列番号：5に示す）またはその一部を基に、種々の他の生物からこれと相同性の高いDNAを単離し、さらに単離したDNAから「BG3」タンパク質と同等の機能を有するタンパク質を得ることも常套手段である。即ち、当業者であれば、ヒト「BG3」cDNAとハイブリダイズするDNAがコードするタンパク質であって、機能的に同等なタンパク質を調製することが可能であり、これら

のタンパク質もまた本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質に含まれる。機能的に同等なタンパク質を単離する他の生物としては、例えば、マウス、ラット、ウサギ、ウシ、イヌ、サルなどが挙げられるが、これらに制限されない。「BG3」タンパク質と機能的に同等なタンパク質をコードするcDNAを単離するには、例えばこれら生物の心臓、胎盤および肺の組織が単離に適していると考えられる。

#### 【0035】

ヒト「BG3」タンパク質と同等の機能を有するタンパク質をコードするDNAは、通常、ヒト「BG3」cDNAの塩基配列（配列番号：5）と高い相同意を有する。高い相同意とは、塩基レベルで少なくとも70%以上、好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上の配列の同一性を指す。配列の相同意は、FASTAプログラムを利用して決定することができる。

#### 【0036】

ヒト「BG3」cDNAと相同意の高いDNAを単離するためのハイブリダイゼーションの条件としては、通常、ハイブリダイゼーションを「6 × SSC、40 % ホルムアミド、25 °C」、洗浄を「1 × SSC、55 °C」で行う。好ましい条件としては、ハイブリダイゼーションを「6 × SSC、40 % ホルムアミド、37 °C」、洗浄を「0.2 × SSC、55 °C」で行う。さらに好ましい条件としては、ハイブリダイゼーションを「6 × SSC、50 % ホルムアミド、37 °C」、洗浄を「0.1 × SSC、62 °C」で行う。なお、当業者であれば、SSCの希釀率、ホルムアミド濃度、温度などの諸条件を適宜選択することで、上記の条件と同様のストリンジエンシーのハイブリダイゼーション条件を実現することができる。

#### 【0037】

また、本発明は、上記本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質の部分ペプチドを包含する。本発明の部分ペプチドとしては、例えば、本発明のタンパク質のうち、生体内に存在するリガンドとの結合部位に相当するペプチドが挙げられる。このような部分ペプチドは、生体投与することで、本来のリガンドと拮抗的に結合し本発明のレセプタータンパク質とリガンドとの結合を競合阻害することが可能である。また、同様にGタンパク質との結合部位に相当する部分ペ

ペプチドを用いれば、本発明のタンパク質と細胞内Gタンパク質との結合を拮抗的に競合阻害することが可能である。これら部分ペプチドは、本発明のタンパク質を介したシグナル伝達の阻害剤として有用である。また、本発明の部分ペプチドとしては、例えば、本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質からシグナル配列が除去されたタンパク質が含まれる。また、本発明の部分ペプチドとしては、例えば、本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質のN末端領域の部分ペプチドが挙げられ、該ペプチドは抗体の調製に利用することができる。本発明のタンパク質に特異的なアミノ酸配列を有する部分ポリペプチドは、少なくとも7または8アミノ酸、好ましくは15アミノ酸、さらに好ましくは20アミノ酸の鎖長を有する。

#### 【0038】

また、本発明は、上記本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質またはその部分ペプチドをコードするDNAに関する。本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質やその部分ペプチドをコードするDNAとしては、これらタンパク質やペプチドをコードしうるものであれば特に制限はなく、cDNA、ゲノムDNA、および合成DNAが含まれる。また、本発明のタンパク質をコードしうる限り、遺伝暗号の縮重に基づく任意の塩基配列を有するDNAが含まれる。

#### 【0039】

本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質をコードするcDNAは、例えば、配列番号：5に記載のcDNAあるいはその断片、それらに相補的なRNA、または該cDNAの配列の一部を含む合成オリゴヌクレオチドを<sup>32</sup>Pなどで標識し、本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質が発現している組織（例えば心臓、胎盤および肺の組織）由来のcDNAライブラリーにハイブリダイズさせることによりスクリーニングすることができる。あるいは、これらcDNAの塩基配列に対応するオリゴヌクレオチドを合成し、適当な組織（例えば心臓、胎盤および肺の組織）由来のcDNAを鑄型にポリメラーゼ連鎖反応により増幅し、クローニングすることもできる。ゲノムDNAは、例えば、配列番号：5に記載のcDNAあるいはその断片、それらに相補的なRNA、または該cDNAの配列の一部を含む合成オリゴヌクレオチドを<sup>32</sup>Pなどで標識し、ゲノムDNAライブラリーにハイブリダイズさせ

ることによりスクリーニングすることができる。あるいは、これらcDNAの塩基配列に対応するオリゴヌクレオチドを合成し、ゲノムDNAを鑄型にポリメラーゼ連鎖反応により増幅し、クローニングすることもできる。一方、合成DNAは、例えば、配列番号：5に記載のcDNAの部分配列を持つオリゴヌクレオチドを化学合成し、アニーリングさせて二本鎖にし、DNAリガーゼで結合させることにより調製することができる (Khorana, H. G. et al., *J. Biol. Chem.* 251, 565-570 (1976); Goeddel D. V. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 106-10 (1979))。

## 【0040】

これらDNAは、組換えタンパク質の生産に有用である。即ち、上記本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質をコードするDNA（例えば、配列番号：5に記載のDNA）を適当な発現ベクターに挿入し、該ベクターを適当な細胞に導入して得た形質転換体を培養し、発現させたタンパク質を精製することにより本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質を組換えタンパク質として調製することが可能である。本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質はレセプタータンパク質であるため、細胞膜に発現させて調製することが可能である。

## 【0041】

具体的には、宿主が大腸菌エシェリシア・コリ (*Escherichia coli*) の場合、プラスミドベクターpET-3 (Rosenberg, A. H. et al., *Gene* 56, 125-35 (1987))、pGEX-1 (Smith, D. B. and Johnson, K. S., *Gene* 67, 31-40 (1988)) などが用いられる。大腸菌の形質転換は、Hanahan法 (Hanahan, D., *J. Mol. Biol.* 166, 557-580 (1983))、電気穿孔法 (Dower, W. J. et al., *Nucl. Acids Res.* 16, 6127-6145 (1988)) などで行う。宿主が分裂酵母シゾサッカロマイセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) の場合には、プラスミドベクターpESP-1 (Lu, Q. et al., *Gene* 200, 135-144 (1997)) などが用いられる。酵母の形質転換は、例えば、スフェロプラスト法 (Beach, D. and Nurse, P., *Nature* 290, 140 (1981))、酢酸リチウム法 (Okazaki, K. et al., *Nucleic Acids Res.* 18, 6485-6489 (1990)) などにより行なわれる。

## 【0042】

一方、宿主が哺乳動物細胞、例えば、チャイニーズハムスター卵巣由来細胞CH0、ヒトHeLa細胞などの場合、pMSG (CLONTECH社) などのベクターが用いられる。哺乳動物細胞への組換えDNAの導入は、リン酸カルシウム法 (Graham, F. L. and van der Eb, A. J., *Virology* 52, 456-467 (1973))、DEAE-デキストラン法 (Sussman, D. J. and Milman, G., *Mol. Cell. Biol.* 4, 1641-1643 (1984))、リポフェクション法 (Felgner, P. L. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 84, 7413-7417 (1987))、電気穿孔法 (Neumann, E. et al., *EMBO J.* 1, 841-845 (1982)) などで行われる。宿主が昆虫細胞の場合には、バキュロウイルスベクターpBacPAK8/9 (CLONTECH社) などが用いられる。昆虫細胞の形質転換は、例えば、文献 (バイオ/テクノロジー (Bio/Technology), 6, 47-55(1980)) などに記載の方法に従って行なうことができる。

## 【0043】

宿主細胞において発現させた組換えタンパク質は、公知の方法により精製することができる。また、例えば、N末端にヒスチジン残基のタグ、グルタチオンSトランスフェラーゼ (GST) などを結合した融合タンパク質の形で合成し、金属キレート樹脂、GST親和性レジンに結合させることにより精製することができる (Smith, M. C. et al., *J. Biol. Chem.* 263, 7211-7215 (1988))。例えば、ベクターとしてpESP-1を用いた場合、目的のタンパク質は、グルタチオンSトランスフェラーゼ (GST) との融合タンパク質として合成されるため、GST親和性レジンに結合させることより組換えタンパク質を精製できる。融合タンパク質から目的タンパク質を分離するには、例えば、トロンビン、血液凝固因子Xaなどで切断する。

## 【0044】

本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質をコードするDNAは、また、その変異に起因する疾患の遺伝子治療に応用することも可能である。遺伝子治療に用いる場合には、ヒト細胞への遺伝子導入には、レトロウイルスベクター (Darnos, O. and Mulligan, R. C., *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 85, 6460-6464 (1988); Dranoff, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 90, 3539-3543 (1993))、アデノウイルスベクター (Wickham, T. J. et al., *Cell* 73, 309-319 (1

993))などを用いる方法が用いられている。患者への投与法としては、骨髓移植、皮下注射、静脈注射などが用いられる (Asano, S., タンパク質核酸酵素, 40, 2491-2495 (1995))。

#### 【0045】

本発明はまた、配列番号：5に記載の塩基配列からなるDNAと特異的にハイブリダイズし、少なくとも15塩基の鎖長を有するDNAに関する。「特異的にハイブリダイズする」とは、通常のハイブリダイゼーション条件下、好ましくはストリンジエントなハイブリダイゼーション条件下で、他のタンパク質をコードするDNAとのクロスハイブリダイゼーションが有意に生じないことを意味する。このようなDNAには、本発明のタンパク質をコードするDNA又は該DNAと相補的なDNAと特異的にハイブリダイズし得るプローブやプライマー、ヌクレオチド又はヌクレオチド誘導体（例えばアンチセンスオリゴヌクレオチドやリボザイム等）が含まれる。

#### 【0046】

上記のような本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質をコードするcDNAあるいはその配列の一部を含むオリゴヌクレオチドは、当該遺伝子あるいはcDNAのクローニングあるいはPCRによる増幅に利用できる。さらに、制限断片長多型 (RFLP) 、1本鎖DNA高次構造多型 (SSCP) などの方法により、遺伝子あるいはcDNAの多型あるいは異常の検出に利用できる。

#### 【0047】

また、本発明は、本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質に結合する抗体に関する。本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質に結合する抗体は、当業者に公知の方法（例えば、「新生化学実験講座1, タンパク質 I, 389-406, 東京化学同人」参照）により調製することが可能である。ポリクローナル抗体の調製は、例えば、以下の如く行う。ウサギ、モルモット、マウス、ニワトリなどの免疫動物に適量の上記タンパク質またはペプチドを投与する。投与は、抗体産生を促進するアジュバント (FIAやFCA) と共にあってもよい。投与は、通常、数週間ごとに行う。免疫を複数回行うことにより、抗体価を上昇させることができる。最終免疫後、免疫動物から採血を行うことにより抗血清が得られる。

この抗血清に対し、例えば、硫酸アンモニウム沈殿や陰イオンクロマトグラフィーによる分画、プロテインAや固定化抗原を用いたアフィニティー精製を行うことにより、ポリクローナル抗体を調製することができる。一方、モノクローナル抗体の調製は、例えば、以下の如く行う。本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質もしくはその部分ペプチドを、上記と同様に免疫動物に免疫し、最終免疫後、この免疫動物から脾臓またはリンパ節を採取する。この脾臓またはリンパ節に含まれる抗体産生細胞とミエローマ細胞とをポリエチレングリコールなどを用いて融合し、ハイブリドーマを調製する。目的のハイブリドーマをスクリーニングし、これを培養し、その培養上清からモノクローナル抗体を調製することができる。モノクローナル抗体の精製は、例えば、硫酸アンモニウム沈殿や陰イオンクロマトグラフィーによる分画、プロテインAや固定化抗原を用いたアフィニティー精製により行うことができる。これにより調製された抗体は、本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質のアフィニティー精製のために用いられる他、本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質の発現異常に起因する疾患の検査や抗体治療、本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質の発現量の検出などに利用することが可能である。

#### 【0048】

抗体治療に用いる場合、ヒト型抗体もしくはヒト抗体であることが好ましい。ヒト型抗体は、例えば、マウス-ヒトキメラ抗体であれば、本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質に対する抗体を産生するマウス細胞から抗体遺伝子を単離し、そのH鎖定常部をヒトIgE H鎖定常部遺伝子に組換え、マウス骨髄腫細胞J558Lに導入することにより調製できる (Neuberger, M. S. et al., Nature 314, 268-270 (1985))。また、ヒト抗体は、免疫系をヒトに入れ換えたマウスに本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質を免疫することにより調製することが可能である。

#### 【0049】

また、本発明は、本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質に対するリガンドのスクリーニング方法に関する。このスクリーニング方法においては、本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質もしくはその部分ペプチドに

被検化合物を接触させ、これらタンパク質もしくはペプチドに結合する化合物を選択する工程を含む。被検化合物としては、例えば、アセチルコリン、アデノシン、アドレナリン、ノルアドレナリン、アンジオテンシン、ボムベシン、ブラジキニン、C5aアナフィラトキシン、カルシトニン、カナビノイド、ケモカイン、コレシストキニン、ドーパミン、エンドセリン、フォルミルメチオニルペプチド、GABA、ガラニン、グルカゴン、グルタミン酸、グリコペプチドホルモン、ヒスタミン、5-ヒドロキシトリプトファン、ロイコトリエン、メラノコルチン、神経ペプチドY、ニューロテンシン、オドラント、オピオイドペプチド、オプシン、パラサイロイドホルモン、血小板活性化因子、プロスタノイド、ソマトスタチン、タキキニン、トロンビン、サイロトロピン放出ホルモン、バソプレシン、オキシトシン (Watson, S. and Arkinstall, S., *The G-Protein Linked Receptor FactsBook*, Academic Press (1994))、CGRP (カルシトニン遺伝子関連タンパク質)、アドレノメジュリン、アミリン、セロトニンなどの公知の化合物、その他の精製タンパク質、遺伝子 (ライブラリーも含む) の発現産物、リガンドが存在していることが予想される組織もしくは細胞 (例えば心臓、肺、および胎盤など) の抽出液、細胞培養上清などが用いられる。

## 【0050】

スクリーニングに用いる本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質は、例えば、所望の細胞 (該タンパク質を発現するように処理した形質転換体を含む) 内または細胞表面に発現した形態、該細胞の細胞膜画分としての形態、アフィニティーカラムに結合した形態であってもよい。スクリーニングに用いる被検化合物は、必要に応じて適宜標識して用いられる。標識としては、例えば、放射標識、蛍光標識などが挙げられるが、これらに制限されない。

## 【0051】

本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質と被検化合物との結合は、本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質に結合した化合物に付された標識による検出 (例えば、結合量を放射活性や蛍光強度により検出する) のほか、被検化合物の細胞表面上の本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質への結合による細胞内へのシグナル伝達 (例えば、Gタンパク質の活性化、 $Ca^{2+}$

<sup>+</sup> またはcAMPの濃度変化、ホスホリパーゼCの活性化、pHの変化) を指標に検出することもできる。具体的な方法については、例えば、文献 (Cell Calcium 14, 663-671(1993)、Analytical Biochemistry 226,349-354(1995)、J.Biol.Chem.268,5957-5964(1993)、Cell 92,573-585(1998)、Nature 393,272-273(1998)) や公報 (特開平9-268号公報) の記載に準じて行うことができる。その他、TWOハイブリッドシステム (Zervos et al.,Cell 72,223-232(1994)、Fritz et al.,Nature 376,530-533(1995)) を利用したレポーター遺伝子の活性の検出によっても結合を検出することができる。

### 【0052】

また、本発明は、本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質とそのリガンドとの結合を阻害する活性を有する化合物のスクリーニング方法に関する。このスクリーニング方法は、(a) 被検化合物の存在下で本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質もしくはその部分ペプチドにリガンドを接触させ、該タンパク質もしくはその部分ペプチドとリガンドとの結合活性を検出する工程、および(b) 工程(a)で検出された結合活性を、被検化合物非存在下での結合活性と比較し、本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質もしくはその部分ペプチドとリガンドとの結合活性を低下させる化合物を選択する工程を含む。被検化合物としては、タンパク質、ペプチド、非ペプチド性化合物、人工的に合成された化合物、組織や細胞の抽出液、血清などが挙げられるが、これらに制限されない。スクリーニングに用いる本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質は、例えば、所望の細胞 (該タンパク質を発現するように処理した形質転換体を含む) 内または細胞表面に発現した形態、該細胞の細胞膜画分としての形態、アフィニティーカラムに結合した形態であってもよい。スクリーニングに利用するリガンドは必要に応じて適宜標識して用いられる。標識としては、例えば、放射標識、蛍光標識などが挙げられるが、これらに制限されない。

### 【0053】

本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質もしくはその部分ペプチドとリガンドとの結合活性は、本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質もしくはその部分ペプチドに結合したリガンドに付された標識による検出 (例え

ば、結合量を放射活性や蛍光強度により検出する) のほか、細胞表面上の本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質への被検化合物の結合による細胞内へのシグナル伝達(例えば、Gタンパク質の活性化、 $Ca^{2+}$  またはcAMPの濃度変化、ホスホリパーゼCの活性化、pHの変化) を指標に検出することもできる。具体的な方法については、例えば、文献 (Cell Calcium 14,663-671(1993)、Analytical Biochemistry 226,349-354(1995)、J.Biol.Chem.268,5957-5964(1993)、Cell 92,573-585(1998)、Nature 393,272-273(1998)) や公報(特開平9-268号公報)の記載に準じて行うことができる。

#### 【0054】

検出の結果、被検化合物の存在下における結合活性が、被検化合物の非存在下における結合活性(対照)より低い値を示した場合には、該被検化合物は、本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質もしくはその部分ペプチドとリガンドとの結合を阻害する活性を有すると判定される。このような化合物は、本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質に結合して細胞内へのシグナル伝達を誘導する活性を有する化合物(アゴニスト)および該活性を有しない化合物(アンタゴニスト)などが含まれる。アゴニストは、本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質に対するリガンドと同様の生理活性を有しており、一方、アンタゴニストは、本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質に対するリガンドが有する生理活性を抑制する。このため、これらアゴニストやアンタゴニストは、本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質を介したシグナル伝達系の異常などに起因する疾患の治療などのための医薬組成物として有用である。

#### 【0055】

本発明のスクリーニング方法により単離される化合物を薬剤として用いる場合には、単離された化合物自体を直接患者に投与する以外に、公知の製剤学的方法により製剤化して投与を行うことも可能である。例えば、薬理学上許容される担体もしくは媒体、具体的には、滅菌水や生理食塩水、植物油、乳化剤、懸濁剤、界面活性剤、安定剤、結合剤、滑沢剤、甘味料、香料、および着色剤などと適宜組み合わせて製剤化して投与することが考えられる。患者への投与は、例えば、

動脈内注射、静脈内注射、皮下注射などのほか、鼻腔内的、経気管支的、筋内的、または経口的に当業者に公知の方法により行いうる。投与量は、患者の体重や年齢、投与方法などにより変動するが、当業者であれば適当な投与量を適宜選択することが可能である。また、該化合物がDNAによりコードされうるものであれば、該DNAを遺伝子治療用ベクターに組込み、遺伝子治療を行うことも考えられる。投与量、投与方法は、患者の体重や年齢、症状などにより変動するが、当業者であれば適宜選択することが可能である。

## 【0056】

また、本発明は、本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質もしくはその部分ペプチドを含有することを特徴とする、本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質とそのリガンドとの結合を阻害する化合物のスクリーニング用キットに関する。本発明のキットにおける本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質もしくはその部分ペプチドは、例えば、所望の細胞（該タンパク質を発現するように処理した形質転換体を含む）内または細胞表面に発現した形態、該細胞の細胞膜画分としての形態、アフィニティーカラムに結合した形態であってもよい。本発明のキットの他の要素としては、上記レセプタータンパク質標品以外に、例えば、リガンド標品（標識されたもの、および標識されていないもの）、リガンドとレセプタータンパク質の反応のための緩衝液、洗浄液などが含まれていてもよい。リガンドに付される標識としては、例えば、放射標識、蛍光標識などが挙げられる。本発明のキットの利用は、例えば、公報（特開平9-268号公報）の記載に準じて行うことができる。

## 【0057】

## 【実施例】

以下に実施例を示して、本発明をより詳細に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

## 【0058】

[実施例1] ヒトGタンパク質共役型レセプター遺伝子の単離  
<1> Gene Trapperの操作、プローブのデザイン  
Gタンパク質共役型レセプターは、細胞膜を7回貫通するという構造上の特徴

を有し、膜貫通領域およびその近傍のアミノ酸配列においてDNAおよびアミノ酸配列でよく保存されている。そこで、既知のGタンパク質共役型レセプターであるマウス神経ペプチドYレセプターY1 (GenBank Accession Number Z18280) 、ラットY1 (同Z11504) 、ヒトY1 (同M84755) 、マウス神経ペプチドY受容体Y4 (同U40189) 、ラットY4 (同Z68180) 、ヒトY4 (同Z66526) 、マウス神経ペプチドY受容体Y6 (同U58367) においてよく保存されている第2膜貫通領域のDNA配列の比較から、Fgセンスプライマー (5'-BATNGCCAAC CTBKCCCTTCT C-3' /配列番号：1 ; 21mer, Degeneracy 72) (B=G,TまたはC, K=GまたはT, N=A,C,GまたはT) を合成した。多くのレセプターcDNAと配列の一致性を高めるために混合塩基を導入している。

#### 【0059】

Biotin-Avidin Capture法としてGene Trapper (GIBCO BRL社) を用いた。これは、f1 oriを持つプラスミドライブラリーに対してGene IIとExo III nuclease を用いて1本鎖のプラスミドライブラリーに分解する。目的遺伝子に対するセンス側のプライマーを合成し、これをビオチン化しプローブとする。1本鎖のプラスミドライブラリーとビオチン化プローブをハイブリダイズさせ、これをストレプトアビジンでコートしたマグネットビーズで回収、洗浄し、プローブが特異的に結合した1本鎖のプラスミドDNAを回収する。この1本鎖のプラスミドDNAに対して、同一のプライマーを用いて2本鎖のプラスミドDNAに再合成し、E.coli パルサー (BIORAD社) を用いてXL1 Blue MRF' (宿主用大腸菌) に形質転換した。なお、詳細は添付プロトコールに従った。

#### 【0060】

ヒト胎児脳由来cDNAライブラリー (GIBCO BRL社) をスクリーニングソースとして、Gene Trapper法によって得られたクローンのうち、384個を無作為に拾い、100 μg/mlアンピシリン入りLB培地に植菌、37°Cで一晩培養した。QIA Prep 96 Turbo BioRobot Kit (QIAGEN社) を用いてBioRobot9600 (QIAGEN社) によりプラスミドDNAを精製した。シークエンスはBigDye Primer Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (ABI社) を用いてABI PRISM877 (ABI社) でシークエンス反応を行い、蛍光自動シーケンサー377 (ABI社) を用いて泳動を行った。それぞれのク

ローンの5'側の部分塩基配列を決定し、種々のデータベースに対してホモロジー検索(BALST search)による解析を行った。その結果、既知のGタンパク質共役型レセプターと有意の類似性を示す、新規なGタンパク質共役型レセプターをコードすると考えられるクローンGFgHG0360（配列番号：2）を見出すことができた。

## 【0061】

## &lt;2&gt; シークエンス

GFgHG0360クローンについて、ショットガン法 (Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory manual 2nd edn., (1989)) により塩基配列を決定した。cDNAの断片化には、密閉式超音波生物材料処理装置バイオラプター（東洋電機社）を用い、断片化したDNAを1.2%アガロースゲル電気泳動で分画、0.5~1.0kb付近の断片を切り出し、Gene Clean (Bio 101社) で精製、T4 DNAポリメラーゼ (TAKARA社) で末端を平滑化し、サブクローニングした。得られたクローンについてシークエンス反応を行った。得られたDNA配列をDNAシークエンスソフト、Se quencher (日立ソフトウェアエンジニアリング社) 及び、RASERGENE (DNASTAR社) を用いて解析した。配列を決定した結果、3'端にpolyA tailを含むが、5'側の開始コドンの前に停止コドンが存在しないので、完全長の翻訳枠でない可能性があった。このGFgHG0360クローンに対し、「BG3」と命名した。

## 【0062】

## [実施例2] ヒトBG3のノザンプロット解析

ヒト組織において「BG3」タンパク質によりコードされるレセプターmRNAの発現パターンを調べるため、ヒトMTNプロットI (CLONTECH社) を用い、ノザンプロット解析を行った。

## 【0063】

先に明らかにしたGFgHG0360クローンの塩基配列を基に、以下に示すセンス、アンチセンスの2つのプライマー (BG3F01; 5'-CCACGCCAACCTGTCCCTCGC-3' /配列番号：3、およびBG3R04; 5'-CTGCTCGTGAGCGACCAGACC-3' /配列番号：4) を合成した。PCRの条件は、94°Cで240秒、94°Cで10秒、55°Cで5秒、74°Cで60秒を30サイクルでPCRを行った。反応混合液の組成としては1xBuffer (標準添付Buffer)

、0.2mM dNTPs、1mM 各プライマー、5ng 鑄型DNA (GFgHG0360) 、0.25Unit/ml KOD' polymerase (TOYOB0社) を用いてPCRを行った。約0.7kbの得られたDNAのバンドをアガロースゲル電気泳動後、ゲルから切り出し、Gene Clean (Bio 101社) を用いて精製し、プローブ作成の鑄型とした。

## 【0064】

標識は、Prime-It II Random Primer Labeling Kit (STRATAGENE社) のプロトコールに従い、 $[\alpha-^{32}\text{P}]$  dCTP (Amersham社) で標識し、プローブを調製した。ハイブリダイゼーション及び洗浄の条件等は、ヒトMTNプロットI (CLONTECH社) のプロトコールに従って行った。最終的な洗浄の条件は、0.1xSSC-0.1%SDS 55°C 30分で行った。ノザンプロット解析により、検定した全組織（心臓、脳、胎盤、肺、肝臓、骨格筋、腎臓、脾臓）においてシグナルが検出された。これらの組織のうち、心臓、胎盤および肺において特に強いシグナルが検出された（図2）。

## 【0065】

## [実施例3] ヒト「BG3」完全長クローンの単離

ヒト「BG3」完全長cDNAを効率よくスクリーニングするために、ノザンプロット解析により発現量の多いことが確認されたヒト心臓由来ZAP II cDNAライブラリー (STRATAGENE社) を用いてスクリーニングを行った。ノザンプロット解析で用いたヒト「BG3」プローブを用いてスクリーニングを行ない、24個のポジティブクローンを得た。得られたクローンの5'、及び3'側からのシークエンスによる塩基配列解析の結果、「BG3」の5'上流領域、完全長の翻訳枠、及び3'下流領域をコードすると思われる、挿入鎖長5.4kbのcDNAクローンを1つ得た。

## 【0066】

このクローン（「E. coli hBG3-17」）を、工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託した。

## (イ) 寄託機関の名称・あて名

名称：通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所

あて名：日本国茨城県つくは市東1丁目1番3号（郵便番号305-8566）

(口) 寄託日(原寄託日) 平成11年3月15日

(ハ) 寄託番号 FERM P-17307

【0067】

GFgHG0360及び、ヒト心臓由来ZAP II cDNAライブラリーのスクリーニングで得られた24個のクローンの5'側の部分塩基配列を整列させ、これを基にシークエンス用プライマーを合成し、BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (ABI) を用いてヒト「BG3」の塩基配列を決定した。得られたDNA配列をDNAシークエンスソフト、Sequencher (日立ソフトウェアエンジニアリング社) 及び、RASERGENE (DNASTAR社) を用いて解析した。

【0068】

その結果、このcDNA (配列番号: 5) は、874アミノ酸残基のタンパク質をコードする翻訳枠 (オープンリーディングフレーム) (配列番号: 6) を含有することが判明した。また、3'端にpolyA tailを含み、5'端の開始コドンの前に停止コドンが存在することから、完全長の翻訳枠を含むと考えられる。

【0069】

このアミノ酸配列を解析したところ、Gタンパク質共役型レセプタータンパク質に特徴的な疎水性ドメインの第1、第2、第3、第4、第5、第6および第7膜貫通領域が疎水性プロット上で確認された(図1)。また、N端に疎水性に富んだシグナルペプチドが確認された。

【0070】

[実施例4] 「BG3」のサザンプロット解析

「BG3」タンパク質と同等の機能を有するタンパク質をコードする遺伝子が、生物の種を越えて保存されているかどうかを解析した。EcoRI制限酵素により完全消化されたヒト、サル、ラット、マウス、イヌ、ウシ、ウサギ、ニワトリ、酵母のゲノムDNAがプロットされているZOO-BLOT (CLONTECH社) を用いて、サザンプロット解析を行った。

【0071】

「BG3」ノーザンプロット解析で用いたものと同じプライマーを用いて、実施例2と同様にして<sup>32</sup>P標識プローブを調製した。ハイブリダイゼーション及び洗

浄の条件等は、ZOO-BLOT (CLONTECH社) のプロトコールに従って行った。最終的な洗浄の条件は、0.1 × SSC - 0.1% SDS 55°C 30分で行った。サザンプロット解析により、検定したヒト、サル、ラット、マウス、イヌ、ウシ、ウサギ、ニワトリ、酵母のゲノムDNAのうち、ヒト、サル、ラット、マウス、イヌ、ウシ、ウサギにいたる哺乳動物において、それぞれ複数のバンドのシグナルが検出された（図3）。

#### 【0072】

ヒト「BG3」タンパク質をコードするDNAをプローブとしたハイブリダイゼーションにより哺乳動物のゲノムDNAでシグナルが検出されたことから、「BG3」タンパク質と同等の機能を有するタンパク質をコードする遺伝子が、生物の種を越えて保存されていることが示唆される。このことは、また、「BG3」タンパク質が重要な機能を担っており、種々の疾患治療薬開発の標的タンパク質になり得ることを示唆する。

#### 【0073】

サザンプロット解析において複数からなるバンドが検出されたことから、「BG3」タンパク質と同等の機能を有するタンパク質をコードするDNAがゲノム上において、複数のエクソン・イントロン構造をとっていることが示唆される。複数のエクソン・イントロン構造をとることで、種々のオルターナティブ・スプライシングにより、同じ「BG3」タンパク質をコードする1つの遺伝子から、異なる機能を有する「BG3」タンパク質のスプライシング・フォームが合成されている可能性がある。また一方で、「BG3」タンパク質と同等の機能を有する別のタンパク質をコードする遺伝子、あるいは、「BG3」の塩基配列に部分的に高い相同性を持つ、「BG3」タンパク質とは異なる機能を有する全く別のタンパク質をコードする遺伝子が存在している可能性もある。

#### 【0074】

##### 【発明の効果】

本発明により、複数の組織で発現する新規なGタンパク質共役型レセプタータンパク質およびその遺伝子が提供された。これにより該レセプタータンパク質を利用したリガンドや医薬品の候補化合物のスクリーニングが可能となった。これ

ラリガンドや医薬品の候補化合物は、例えば、本発明のGタンパク質共役型レセプタータンパク質を介したシグナル伝達系の異常などに起因する疾患の診断や治療などへの利用が期待される。

【0075】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> BANYU PHARMACEUTICAL CO., LTD.

<120> G PROTEIN-COUPLED RECEPTORS, BG3

<130> B1-101

<140>

<141>

<160> 6

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
synthesized primer sequence

&lt;400&gt; 1

batngccaac ctbkccttct c

21

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 3117

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 2

atcagctatg tgggctgctc cctctccgtg ctctgcctgg tggccacgct ggtcaccc 60

gccgtgctgt cctccgtgag caccatccgg aaccagcgct accacatcca cgccaacctg 120

tccttcgccc tgctggtggc ccaggtccctg ctgctcatta gtttccgcct cgagccgggc 180

acgacccccc gccaagtgat ggccgtgctc ctacactact ttttcctgag tgccttcgca 240

tggatgctgg tggagggct gcacctctac agcatggta tcaaggctt tgggtcggag 300

gacagcaagc accgttacta ctatggatg ggtatgggtt ttcctcttct gatctgcattc 360

atttcactgt catttgcatt ggacagttac ggaacaagca acaattgctg gctgtcggtt 420

gcgagtgccg ccatctgggc cttttagcc cctgccctgt ttgtcatcgt ggtcaacatt 480

ggcattcctca tcgctgtgac cagagtcatc tcacagatca gcgccgacaa ctacaagatc 540

catggagacc ccagtgcctt caagttgacg gccaaggcag tggccgtgct gctgccatc 600

ctgggtacct cgtgggtctt tggcgtgctt gctgtcaacg gttgtgctgt gttttccag 660

tacatgtttg ccacgctcaa ctccctgcag ggactgttca tattcctctt tcattgtctc 720

ctgaatticag aggtgagagc cgccttcaag cacaacca aggtctggtc gctcacgagc 780

agctccgccc gcaccccaa cgcaagcccc ttccactcgg acctcatgaa tgggacccgg 840

ccaggcatgg cctccaccaa gctcagccct tggacaaga gcagccactc tgcccacccgc 900

gtcgacctgt cagccgtgtg agccgggagg ctgccaacca ggccaggctg cgctcagaac 960

acacccccc aaacagaatg aaatgccccca ctttgcctt tggaccctct ctttgctgct 1020

gtctggacat ggggtttgtg gccccgagac agctgtccctc ccctgtgact ctggctgtcg 1080

gagcacactg ctcagccag cagcctgatg cccaggccag cgtggccct cctgccttgc 1140

atccacccgt gggctgagtg acttcctcgg gggattccca ggacacagtg gcctgactgt 1200

gatggtgccc ttgaggctcc cttcatcact cagcatcaga cccagcgagg ccaggacact 1260

cggggccggt cccgcagcac caggagggga tggcgtgcctt gttggcgttc 1320

gggactcagg gccaaagagg tggttcaggt ccccacgcac ctcagtcag ggcaggcag 1380

ctgggggtgt gtggggaga gcatgcggag tccccagtgt ctgaatccac tgagtggta 1440

gttccccaca gccggcgcta gctggtgtgt gtctctgttag gtggtgccgg cgtggccaa 1500  
cctgtgctgt gtcatcagtt gggggccctt gcccaagccg agctcgagcc gtgggcggga 1560  
gtcggtgact ctccaggtga gggcgacccc tctgcccgtt ctttgggggg gtccctctg 1620  
ctcacgtgaa gagccgctct gggccttgag gctgcctgat ggtgcctgtg cttgggggag 1680  
cttctcggcc atccgctgtg agttttgcct ctttggaccc caattcggcc ttaagatgcc 1740  
ctcctccctc gtgtgccagc ctcccttggtt gttcttggc cacaggagct ggccgtgtcc 1800  
ccgcagtgcc tgggtgccag gtggaaagtg gagggcattt tccagggcac tgctttcccc 1860  
agaggcttcc tcatggctca caggcactct acgaagttc taatggcag accacgcggc 1920  
aggtagcaca gtgcgctccg tctggtcacc atgagaccga cctgcgctga gtccccactg 1980  
acctggagag ggagggctgg tgacagccgt gtcttctgtg ttgagggaaa ttatggact 2040  
cagattcagc cccagaggag atggataat tgttatggac ccatgtgtgg gcatgatcct 2100  
gtggaacaca ggtttggat catagatgtg aattaagaca ccaccgagat acgggctgtg 2160  
agtttcatac tgtgctgata gcactcgtgg tgtctgtgaa atgtggtaa gacattcaaa 2220  
cctgggtttt atactggaaa ctcttccttt aaaactgtga ccatgatttc attcagccccc 2280

tccacacccc tatgtctgcc ttgtttcaga gtgagtttc tatggagcct gtggccctt 2340  
tgccggccac ctggggcctt cttatgtaa ctctccctt ggtcgccctgg agtggaccac 2400  
tcatctgcag gcctctcctg catggggagg gtaggcagg agcagcatgt ctgcagggtt 2460  
gaacctttgc tttctgtca ggcgaggccc aggtgcacc agccacctgc cacatggta 2520  
cagtgccacg ggccctgcgt atggccctg caaccgtgct ctggcggca cacctggctg 2580  
ctgcaggcca aggccgctgt tcagtgaaga gtcccatgtt tagatggac taaagtccca 2640  
tgttagcca ctgccccagg ctcccgtgac cccagaaacc aggtcacatg gaccacagt 2700  
ccagatcctc atcacgccgg tgagcaccta gaagtgagaa cactgtattc ctacaatgta 2760  
cacttggata tttctcctta ttttagttct agtgaacaa atcaagtaag gaactatctt 2820  
tagtttagat ggaatttattt gtttttaattt gttgccgtat tcacatatat agctaatttt 2880  
tcaagataag taatgaacaa aacctgtcta aacctttgt ttccaatgaa tgaaagtcat 2940  
gcactttattt tataggctct atgtttggc ttctgcagta cttttatttt ctatacataaa 3000  
tttggccaaa aataagaaat tggaaagaat gaaatgtta gtttatagta gaagaaagat 3060  
gatgacacta agttgtgaaa atatgttg attttatgaa aataaactca tgtcctg 3117

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
synthesized primer sequence

<400> 3

ccacgccaac ctgtccttcg c

21

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
synthesized primer sequence

<400> 4

ctgctcgta gcgaccagac c

21

<210> 5

<211> 5340

<212> DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (517)..(3138)

&lt;400&gt; 5

ttgagccaga ccagaaggag ctcgagagcg gccgcaggac aagcccgagg agcaggcggg 60

cgctccaggg gaaaaccacg cacaaaacct tcttcagaga aaagggaaagc tccaaacctg 120

actgagacaa acggaggctc ttgaaataaa aagaaaatac cgaggacaa acagcctccc 180

gtccccgggc gcaggtcgcg gtcacagtgg tgacctggga ttgcttccc aggactgcga 240

gtcgggtttg gtttctcct ccctgcattc cacagctgct ctggtcatcg caacgtgtt 300

attgatcaact gaagaatctc aagtttttag acgaggaaga aacaccatt aggtctccaa 360

gacagctgtg tttcacaac tttagggaga cagaaattt ctccctgga acctgtgaaa 420

atgtccctt tccaaggaag tgaaggtaa gaggtccgt tctcacagac cctcagtaat 480

ttcacttggc tccgagctt gacctccgag agagcc atg gaa aag ctg ctg cgg 534

Met Glu Lys Leu Leu Arg

1

5

ctg tgc tgc tgg tac tcc tgg ctg ctg cta ttt tat tac aac ttt cag 582

Leu Cys Cys Trp Tyr Ser Trp Leu Leu Phe Tyr Tyr Asn Phe Gln

10

15

20

gtg cgt ggc gtc tac tcc aga tcg cag gac cat cca gga ttt cag gtg 630  
 Val Arg Gly Val Tyr Ser Arg Ser Gln Asp His Pro Gly Phe Gln Val

25

30

35

ttg gcg tct gct tcc cat tac tgg cca ctg gag aat gtg gat ggg atc 678  
 Leu Ala Ser Ala Ser His Tyr Trp Pro Leu Glu Asn Val Asp Gly Ile  
 40 45 50

cat gaa ctt cag gat aca act gga gat att gtg gaa ggg aag gtc aac 726  
 His Glu Leu Gln Asp Thr Thr Gly Asp Ile Val Glu Gly Lys Val Asn  
 55 60 65 70

aaa ggc att tac ctg aaa gag gaa aag gga gtc acg ctt ctc tat tac 774  
 Lys Gly Ile Tyr Leu Lys Glu Glu Lys Gly Val Thr Leu Leu Tyr Tyr  
 75 80 85

ggc agg tac aac agc tcc tgc atc agc aag cca gag cag tgt ggc cct 822  
 Gly Arg Tyr Asn Ser Ser Cys Ile Ser Lys Pro Glu Gln Cys Gly Pro  
 90 95 100

gaa ggg gtc acg ttt tct ttt ttc tgg aag aca caa gga gaa cag tct 870  
 Glu Gly Val Thr Phe Ser Phe Phe Trp Lys Thr Gln Gly Glu Gln Ser  
 105 110 115

aga cca atc cct tct gcg tat ggg gga cag gtc atc tcc aat ggg ttc 918  
 Arg Pro Ile Pro Ser Ala Tyr Gly Gly Gln Val Ile Ser Asn Gly Phe  
 120 125 130

aaa gtc tgc tcc agc ggt ggc aga ggc tct gtg gag ctg tac acg cgg 966  
 Lys Val Cys Ser Ser Gly Gly Arg Gly Ser Val Glu Leu Tyr Thr Arg  
 135 140 145 150

gac aat tcc atg aca tgg gag gcc tcc ttc agc ccc cca ggc ccc tat 1014  
 Asp Asn Ser Met Thr Trp Glu Ala Ser Phe Ser Pro Pro Gly Pro Tyr  
 155 160 165

tgg act cat gtc cta ttt aca tgg aaa tcc aag gag ggc ctg aaa gtc 1062  
 Trp Thr His Val Leu Phe Thr Trp Lys Ser Lys Glu Gly Leu Lys Val  
 170 175 180

tac gtc aac ggg acc ctg agc acc tct gat ccg agt gga aaa gtg tct 1110  
 Tyr Val Asn Gly Thr Leu Ser Thr Ser Asp Pro Ser Gly Lys Val Ser  
 185 190 195

cgt gac tat gga gag tcc aac gtc aac ctc gtg ata ggg tct gag cag 1158  
 Arg Asp Tyr Gly Glu Ser Asn Val Asn Leu Val Ile Gly Ser Glu Gln  
 200 205 210

gac cag gcc aag tgt tat gag aac ggt gct ttc gat gag ttc atc atc 1206  
 Asp Gln Ala Lys Cys Tyr Glu Asn Gly Ala Phe Asp Glu Phe Ile Ile  
 215 220 225 230

tgg gag cgg gct ctg act ccg gat gag atc gcc atg tac ttc act gct 1254  
 Trp Glu Arg Ala Leu Thr Pro Asp Glu Ile Ala Met Tyr Phe Thr Ala  
 235 240 245

gcc att gga aag cat gct tta ttg tct tca acg ctg cca agc ctc ttc 1302  
 Ala Ile Gly Lys His Ala Leu Leu Ser Ser Thr Leu Pro Ser Leu Phe  
 250 255 260

atg aca tcc aca gca agc ccc gtg atg ccc aca gat gcc tac cat ccc 1350  
 Met Thr Ser Thr Ala Ser Pro Val Met Pro Thr Asp Ala Tyr His Pro  
 265 270 275

atc ata acc aac ctg aca gaa gag aga aaa acc ttc caa agt ccc gga 1398  
 Ile Ile Thr Asn Leu Thr Glu Glu Arg Lys Thr Phe Gln Ser Pro Gly  
 280 285 290

gtg ata ctg agt tac ctc caa aat gta tcc ctc agc tta ccc agt aag 1446  
 Val Ile Leu Ser Tyr Leu Gln Asn Val Ser Leu Ser Leu Pro Ser Lys  
 295 300 305 310

tcc ctc tcg gag cag aca gcc ttg aat ctc acc aag acc ttc tta aaa 1494  
 Ser Leu Ser Glu Gln Thr Ala Leu Asn Leu Thr Lys Thr Phe Leu Lys  
 315 320 325

gcc gtg gga gag atc ctt cta ctg cct ggt tgg att gct ctg tca gag 1542  
 Ala Val Gly Glu Ile Leu Leu Pro Gly Trp Ile Ala Leu Ser Glu  
 330 335 340

gac agc gcc gtg gta ctg agt ctc atc gac act att gac acc gtc atg 1590  
 Asp Ser Ala Val Val Leu Ser Leu Ile Asp Thr Ile Asp Thr Val Met  
 345 350 355

ggc cat gta tcc tcc aac ctg cac ggc agc acg ccc cag gtc acc gtg 1638

Gl ... Val Ser Ser Asn Leu His Gly Ser Thr Pro Gln Val Thr Val

360 365 370

gag ggc tcc tct gcc atg gca gag ttt tcc gtg gcc aaa atc ctg ccc 1686

Glu Gly Ser Ser Ala Met Ala Glu Phe Ser Val Ala Lys Ile Leu Pro

375 380 385 390

aag acc gtg aat tcc tcc cat tac cgc ttc ccg gcc cac ggg cag agc 1734

Lys Thr Val Asn Ser Ser His Tyr Arg Phe Pro Ala His Gly Gln Ser

395 400 405

ttc atc cag atc ccc cac gag gcc ttc cac agg cac gcc tgg agc acc 1782

Phe Ile Gln Ile Pro His Glu Ala Phe His Arg His Ala Trp Ser Thr

410 415 420

gtc gtg ggt ctg ctg tac cac agc atg cac tac tac ctg aac aac atc 1830

Val Val Gly Leu Leu Tyr His Ser Met His Tyr Tyr Leu Asn Asn Ile

425 430 435

tgg ccc gcc cac acc aag atc gcg gag gcc atg cat cac cag gac tgc 1878

Trp Pro Ala His Thr Lys Ile Ala Glu Ala Met His His Gln Asp Cys

440 445 450

ctg ctg ttc gcc acc agc cac ctg att tcc ctg gag gtg tcc cca cca 1926

Leu Leu Phe Ala Thr Ser His Leu Ile Ser Leu Glu Val Ser Pro Pro

455 460 465 470

ccc acc ctg tct cag aac ctg tcg ggc tct cca ctc att acg gtc cac 1974

Pro Thr Leu Ser Gln Asn Leu Ser Gly Ser Pro Leu Ile Thr Val His

475

480

485

ctc aag cac aga ttg aca cgt aag cag cac agt gag gcc acc aac agc 2022

Leu Lys His Arg Leu Thr Arg Lys Gln His Ser Glu Ala Thr Asn Ser

490

495

500

agc aac cga gtc ttc gtg tac tgc gcc ttc ctg gac ttc agc tcc gga 2070

Ser Asn Arg Val Phe Val Tyr Cys Ala Phe Leu Asp Phe Ser Ser Gly

505

510

515

gaa ggg gtc tgg tcg aac cac ggc tgt gcg ctc acg aga gga aac ctc 2118

Glu Gly Val Trp Ser Asn His Gly Cys Ala Leu Thr Arg Gly Asn Leu

520

525

530

acc tac tcc gtc tgc cgc tgc act cac ctc acc aac ttt gcc atc ctc 2166

Thr Tyr Ser Val Cys Arg Cys Thr His Leu Thr Asn Phe Ala Ile Leu

535

540

545

550

atg cag gtg gtc ccg ctg gag ctt gca cgc gga cac cag gtg gcg ctg 2214

Met Gln Val Val Pro Leu Glu Leu Ala Arg Gly His Gln Val Ala Leu

555

560

565

tcg tct atc agc tat gtg ggc tgc tcc ctc tcc gtg ctc tgc ctg gtg 2262

Ser Ser Ile Ser Tyr Val Gly Cys Ser Leu Ser Val Leu Cys Leu Val

570

575

580

gcc acg ctg gtc acc ttc gcc gtg ctg tcc tcc gtg agc acc atc cgg 2310

Ala Thr Leu Val Thr Phe Ala Val Leu Ser Ser Val Ser Thr Ile Arg

585

590

595

aac cag cgc tac cac atc cac gcc aac ctg tcc ttc gcc gtg ctg gtg 2358  
 Asn Gln Arg Tyr His Ile His Ala Asn Leu Ser Phe Ala Val Leu Val  
 600 605 610

gcc cag gtc ctg ctg ctc att agt ttc cgc ctc gag ccg ggc acg acc 2406  
 Ala Gln Val Leu Leu Ile Ser Phe Arg Leu Glu Pro Gly Thr Thr  
 615 620 625 630

ccc tgc caa gtg atg gcc gtg ctc cta cac tac ttc ttc ctg agt gcc 2454  
 Pro Cys Gln Val Met Ala Val Leu Leu His Tyr Phe Phe Leu Ser Ala  
 635 640 645

ttc gca tgg atg ctg gtg gag ggg ctg cac ctc tac agc atg gtg atc 2502  
 Phe Ala Trp Met Leu Val Glu Gly Leu His Leu Tyr Ser Met Val Ile  
 650 655 660

aag gtc ttt ggg tcg gag gac agc aag cac cgt tac tac tat ggg atg 2550  
 Lys Val Phe Gly Ser Glu Asp Ser Lys His Arg Tyr Tyr Gly Met  
 665 670 675

gga tgg ggt ttt cct ctt ctg atc tgc atc att tca ctg tca ttt gcc 2598  
 Gly Trp Gly Phe Pro Leu Leu Ile Cys Ile Ile Ser Leu Ser Phe Ala  
 680 685 690

atg gac agt tac gga aca agc aac aat tgc tgg ctg tcg ttg gcg agt 2646  
 Met Asp Ser Tyr Gly Thr Ser Asn Asn Cys Trp Leu Ser Leu Ala Ser  
 695 700 705 710

ggc gcc atc tgg gcc ttt gta gcc cct gcc ctg ttt gtc atc gtg gtc 2694  
 Gly Ala Ile Trp Ala Phe Val Ala Pro Ala Leu Phe Val Ile Val Val  
 715 720 725

aac att ggc atc ctc atc gct gtg acc aga gtc atc tca cag atc agc 2742  
 Asn Ile Gly Ile Leu Ile Ala Val Thr Arg Val Ile Ser Gln Ile Ser  
 730 735 740

gcc gac aac tac aag atc cat gga gac ccc agt gcc ttc aag ttg acg 2790  
 Ala Asp Asn Tyr Lys Ile His Gly Asp Pro Ser Ala Phe Lys Leu Thr  
 745 750 755

gcc aag gca gtg gcc gtg ctg ctg ccc atc ctg ggt acc tcg tgg gtc 2838  
 Ala Lys Ala Val Ala Val Leu Leu Pro Ile Leu Gly Thr Ser Trp Val  
 760 765 770

ttt ggc gtg ctt gct gtc aac ggt tgt gct gtg gtt ttc cag tac atg 2886  
 Phe Gly Val Leu Ala Val Asn Gly Cys Ala Val Val Phe Gln Tyr Met  
 775 780 785 790

ttt gcc acg ctc aac tcc ctg cag gga ctg ttc ata ttc ctc ttt cat 2934  
 Phe Ala Thr Leu Asn Ser Leu Gln Gly Leu Phe Ile Phe Leu Phe His  
 795 800 805

tgt ctc ctg aat tca gag gtg aga gcc gcc ttc aag cac aaa acc aag 2982  
 Cys Leu Leu Asn Ser Glu Val Arg Ala Ala Phe Lys His Lys Thr Lys  
 810 815 820

gtc tgg tcg ctc acg agc agc tcc gcc cgc acc tcc aac gcg aag ccc 3030

Val Trp Ser Leu Thr Ser Ser Ala Arg Thr Ser Asn Ala Lys Pro

825

830

835

ttc cac tcg gac ctc atg aat ggg acc cgg cca ggc atg gcc tcc acc 3078

Phe His Ser Asp Leu Met Asn Gly Thr Arg Pro Gly Met Ala Ser Thr

840

845

850

aag ctc agc cct tgg gac aag agc agc cac tct gcc cac cgc gtc gac 3126

Lys Leu Ser Pro Trp Asp Lys Ser Ser His Ser Ala His Arg Val Asp

855

860

865

870

ctg tca gcc gtg tgagccggga ggctgccaac caggccaggc tgcgctcaga 3178

Leu Ser Ala Val

acacacccccc cccaaacaga atgaaatgcc ccaccttgc ccatggaccc tctccttgct 3238

gctgtctgga catgggtgtt gtggcccgaa gacagctgtc ctccctgtg actctggctg 3298

tcggagcaca ctgctcagcc cagcagcctg atgcccaggc cagcgtggc cctcctgcct 3358

tgcatccacc cgtgggctga gtgacttcct cgggggattc ccaggacaca gtggcctgac 3418

tgtgatggtg ccctttagcc tcccttcatac actcagcatc agacccagcg aggccaggac 3478

actcggggcc ggtcccgac caccaggagg ggatgttcag cctctgtgcc ttggtggggc 3538

ttggggactc agggccaaag aggtggttca ggtccccacg caccctcagt caggcgcagg 3598

cagctggggg tgtgtggga agagcatgac gagtccccag tgtctgaatc cactgagtgg 3658

tgagttcccc acagccggcg ctagccgtgg tgtgtgtctc ttaggtggt gccggcgtgg 3718

gccaacctgt gctgtgtcat cagttggggg cccctgcca agccgagctc gagccgtggg 3778

cgggagtcgt tgactctcca ggtgagggcg acccctctgc cctgtccttg ggggggtccc 3838

ctctgctcac gtgaagagcc gctctggcc ttgaggctgc ctgatggtgc ctgtgcttgg 3898

gggagcttct cggccatccg ctgtgagttt tgccttttgc gaccccaatt cggcctaag 3958

atgccttcct ccctcggtg ccagcctcct tgggtttct tggccacag gagctcgccg 4018

tgtccccgca gtgcctggtg tccaggtgga aagtggaggg cattttccag ggcactgctt 4078

tccccagagg cttcctcatg gtcacagggc actctacgaa gtttctaattt ggcagaccac 4138

gcggcaggta gcacagtgcg ctccgtctgg tcaccatgag accgacactgc gctgagtcgg 4198

cactgacctg gagagggagg gctggtgaca gccgtgttt ctgtgttgag ggaaatttt 4258

ggactcagac tcagccccag aggagatggg ataattgtta tggacccatg tggggcatg 4318

atcctgtgga acacagggtt gggatcatag atgtgaatta agacaccacc gagatacggg 4378

ctgtgagggtt cataccgtgc tgatagcact cgtggtgtct gtgaaatgtg ggtaagacat 4438

tcaaacctgg ttttgataact ggaaactctt cctttaaaac tgtgaccatg atttcattca 4498.

gccccctccac acccctatgt ctgccttgg tcaagtgag tttctatgg agcctgtggc 4558

cctttgcag cccacacctggt ggcttcttaa tgtaactctt cccctggtcg cctggagtgg 4618

accacatc tgcaggcctc tcctgcattgg ggagggtagg cagggagcag catgtctgca 4678

ggggtaacc tttgctcttc tgtcaggcga ggcccaagct gcaccagcca cctgccacat 4738

ggtgacagtg ccacgggccc tgcgtatggc ccctgcaacc gtgctctggc gggcacacact 4798

ggctgctgca gccaaggcc gctgttcaatg gaagagtccc atgttagta tggactaaag 4858

tcccatgttt agccactgcc ccaggctccc gtgacccag aaaccaggc acatggacca 4918

cagtgccaga tcctcatcac gccggtgagc acctagaatg gagaacactg tattcctaca 4978

atgtacactt ggatatttct ctttatgg tttctatgtca aacaaatcaa gtaaggaact 5038

atcttagtt tagatggaaat tattttttt taattgttgc cgtattcatc tatatacgta 5098

atatttcaag ataagtaatg aacaaaacct gtctaaacct tttgttcca atgaatgaaa 5158

gtcatgcact ttatttatag gctctatgtt ttggcttctg cagtagttt attatctata 5218

cataatttgg caaaaataa gaaattggaa agaatgaaat gttagttt tagtagaaga 5278

aagatgatga cactaagttg tgaaaatatg ttgtgatttt tatgaaataa actcatgtcc 5338

tg

5340

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 874

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 6

Met Glu Lys Leu Leu Arg Leu Cys Cys Trp Tyr Ser Trp Leu Leu Leu  
 1 5 10 15

Phe Tyr Tyr Asn Phe Gln Val Arg Gly Val Tyr Ser Arg Ser Gln Asp  
 20 25 30

His Pro Gly Phe Gln Val Leu Ala Ser Ala Ser His Tyr Trp Pro Leu  
 35 40 45

Glu Asn Val Asp Gly Ile His Glu Leu Gln Asp Thr Thr Gly Asp Ile  
 50 55 60

Val Glu Gly Lys Val Asn Lys Gly Ile Tyr Leu Lys Glu Glu Lys Gly  
 65 70 75 80

Val Thr Leu Leu Tyr Tyr Gly Arg Tyr Asn Ser Ser Cys Ile Ser Lys  
 85 90 95

Pro Glu Gln Cys Gly Pro Glu Gly Val Thr Phe Ser Phe Phe Trp Lys  
 100 105 110

Thr Gln Gly Glu Gln Ser Arg Pro Ile Pro Ser Ala Tyr Gly Gly Gln  
 115 120 125  
  
 Val Ile Ser Asn Gly Phe Lys Val Cys Ser Ser Gly Gly Arg Gly Ser  
 130 135 140  
  
 Val Glu Leu Tyr Thr Arg Asp Asn Ser Met Thr Trp Glu Ala Ser Phe  
 145 150 155 160  
  
 Ser Pro Pro Gly Pro Tyr Trp Thr His Val Leu Phe Thr Trp Lys Ser  
 165 170 175  
  
 Lys Glu Gly Leu Lys Val Tyr Val Asn Gly Thr Leu Ser Thr Ser Asp  
 180 185 190  
  
 Pro Ser Gly Lys Val Ser Arg Asp Tyr Gly Glu Ser Asn Val Asn Leu  
 195 200 205  
  
 Val Ile Gly Ser Glu Gln Asp Gln Ala Lys Cys Tyr Glu Asn Gly Ala  
 210 215 220  
  
 Phe Asp Glu Phe Ile Ile Trp Glu Arg Ala Leu Thr Pro Asp Glu Ile  
 225 230 235 240  
  
 Ala Met Tyr Phe Thr Ala Ala Ile Gly Lys His Ala Leu Leu Ser Ser  
 245 250 255  
  
 Thr Leu Pro Ser Leu Phe Met Thr Ser Thr Ala Ser Pro Val Met Pro  
 260 265 270

Thr Asp Ala Tyr His Pro Ile Ile Thr Asn Leu Thr Glu Glu Arg Lys

275

280

285

Thr Phe Gln Ser Pro Gly Val Ile Leu Ser Tyr Leu Gln Asn Val Ser

290

295

300

Leu Ser Leu Pro Ser Lys Ser Leu Ser Glu Gln Thr Ala Leu Asn Leu

305

310

315

320

Thr Lys Thr Phe Leu Lys Ala Val Gly Glu Ile Leu Leu Leu Pro Gly

325

330

335

Trp Ile Ala Leu Ser Glu Asp Ser Ala Val Val Leu Ser Leu Ile Asp

340

345

350

Thr Ile Asp Thr Val Met Gly His Val Ser Ser Asn Leu His Gly Ser

355

360

365

Thr Pro Gln Val Thr Val Glu Gly Ser Ser Ala Met Ala Glu Phe Ser

370

375

380

Val Ala Lys Ile Leu Pro Lys Thr Val Asn Ser Ser His Tyr Arg Phe

385

390

395

400

Pro Ala His Gly Gln Ser Phe Ile Gln Ile Pro His Glu Ala Phe His

405

410

415

Arg His Ala Trp Ser Thr Val Val Gly Leu Leu Tyr His Ser Met His

420

425

430

Tyr Tyr Leu Asn Asn Ile Trp Pro Ala His Thr Lys Ile Ala Glu Ala

435

440

445

Met His His Gln Asp Cys Leu Leu Phe Ala Thr Ser His Leu Ile Ser

450

455

460

Leu Glu Val Ser Pro Pro Pro Thr Leu Ser Gln Asn Leu Ser Gly Ser

465

470

475

480

Pro Leu Ile Thr Val His Leu Lys His Arg Leu Thr Arg Lys Gln His

485

490

495

Ser Glu Ala Thr Asn Ser Ser Asn Arg Val Phe Val Tyr Cys Ala Phe

500

505

510

Leu Asp Phe Ser Ser Gly Glu Gly Val Trp Ser Asn His Gly Cys Ala

515

520

525

Leu Thr Arg Gly Asn Leu Thr Tyr Ser Val Cys Arg Cys Thr His Leu

530

535

540

Thr Asn Phe Ala Ile Leu Met Gln Val Val Pro Leu Glu Leu Ala Arg

545

550

555

560

Gly His Gln Val Ala Leu Ser Ser Ile Ser Tyr Val Gly Cys Ser Leu

565

570

575

Ser Val Leu Cys Leu Val Ala Thr Leu Val Thr Phe Ala Val Leu Ser

580 585 590

Ser Val Ser Thr Ile Arg Asn Gln Arg Tyr His Ile His Ala Asn Leu

595 600 605

Ser Phe Ala Val Leu Val Ala Gln Val Leu Leu Leu Ile Ser Phe Arg

610 615 620

Leu Glu Pro Gly Thr Thr Pro Cys Gln Val Met Ala Val Leu Leu His

625 630 635 640

Tyr Phe Phe Leu Ser Ala Phe Ala Trp Met Leu Val Glu Gly Leu His

645 650 655

Leu Tyr Ser Met Val Ile Lys Val Phe Gly Ser Glu Asp Ser Lys His

660 665 670

Arg Tyr Tyr Tyr Gly Met Gly Trp Gly Phe Pro Leu Leu Ile Cys Ile

675 680 685

Ile Ser Leu Ser Phe Ala Met Asp Ser Tyr Gly Thr Ser Asn Asn Cys

690 695 700

Trp Leu Ser Leu Ala Ser Gly Ala Ile Trp Ala Phe Val Ala Pro Ala

705 710 715 720

Leu Phe Val Ile Val Val Asn Ile Gly Ile Leu Ile Ala Val Thr Arg

725 730 735

Val Ile Ser Gln Ile Ser Ala Asp Asn Tyr Lys Ile His Gly Asp Pro

740

745

750

Ser Ala Phe Lys Leu Thr Ala Lys Ala Val Ala Val Leu Leu Pro Ile

755

760

765

Leu Gly Thr Ser Trp Val Phe Gly Val Leu Ala Val Asn Gly Cys Ala

770

775

780

Val Val Phe Gln Tyr Met Phe Ala Thr Leu Asn Ser Leu Gln Gly Leu

785

790

795

800

Phe Ile Phe Leu Phe His Cys Leu Leu Asn Ser Glu Val Arg Ala Ala

805

810

815

Phe Lys His Lys Thr Lys Val Trp Ser Leu Thr Ser Ser Ser Ala Arg

820

825

830

Thr Ser Asn Ala Lys Pro Phe His Ser Asp Leu Met Asn Gly Thr Arg

835

840

845

Pro Gly Met Ala Ser Thr Lys Leu Ser Pro Trp Asp Lys Ser Ser His

850

855

860

Ser Ala His Arg Val Asp Leu Ser Ala Val

865

870

【図面の簡単な説明】

【図1】

ヒト「BG3」タンパク質の疎水性プロットを示す。図中のIからVIIの番号はGタンパク質共役型レセプタータンパク質の特徴的な7つの疎水性領域（膜貫通領域）を示す。また、図上の番号は「BG3」タンパク質のアミノ酸の番号を示す。

【図2】

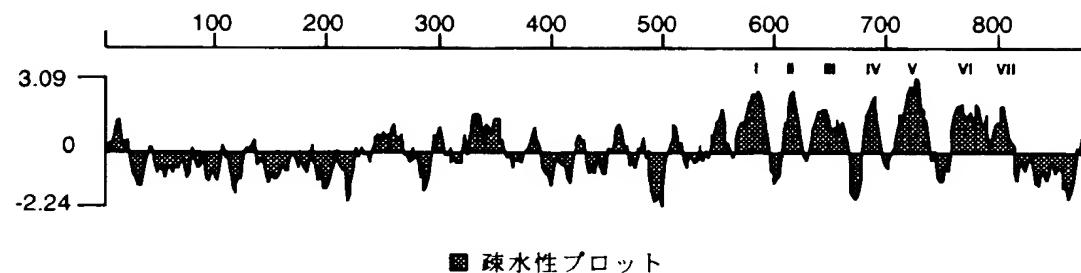
ヒト「BG3」遺伝子の発現の組織特異性をノーザンプロット解析した結果を示す。

【図3】

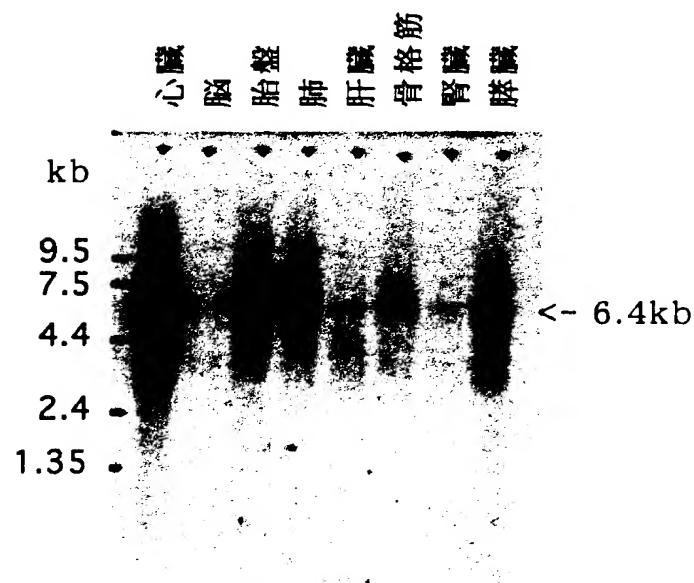
ヒト「BG3」遺伝子のサザンプロット解析の結果を示す。

【書類名】 図面

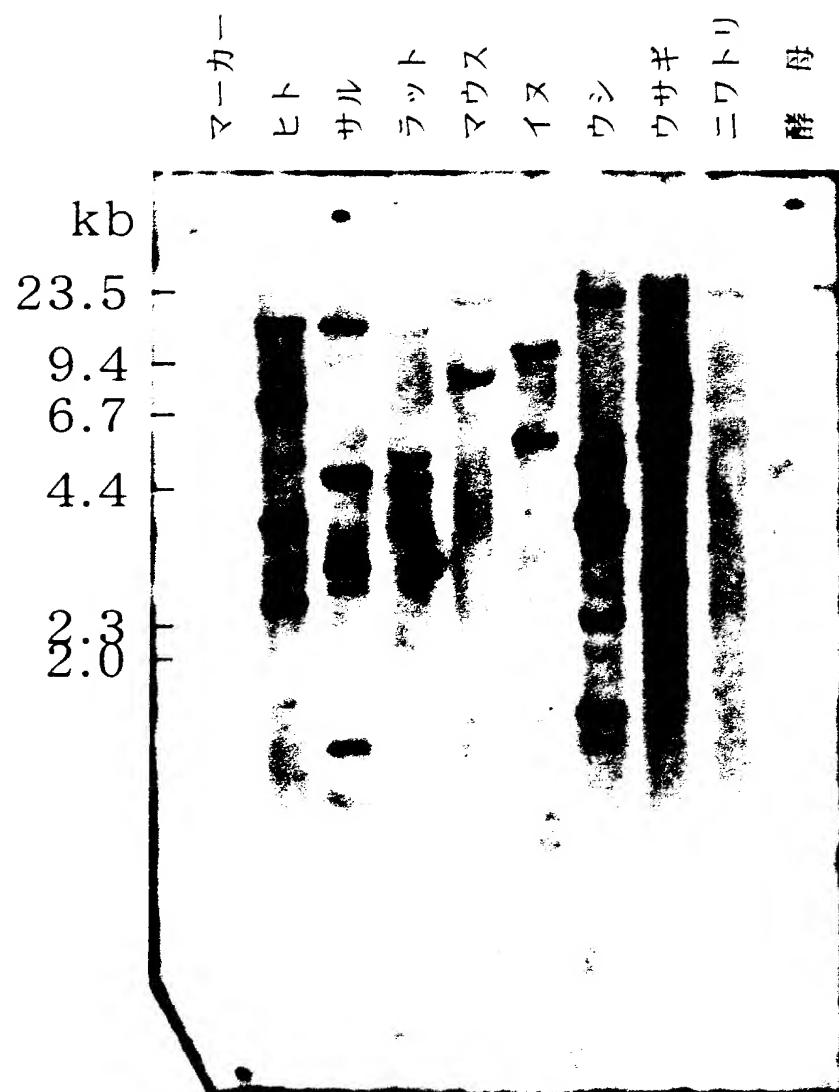
【図1】



【図2】



【図3】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 新規なGタンパク質共役型レセプタータンパク質、並びに該レセプタータンパク質を利用したリガンドおよび医薬品の候補化合物のスクリーニング方法を提供することを課題とする。

【解決手段】 既知のGタンパク質共役型レセプタータンパク質において高度に保存されている領域を独自に抽出し、これに対応するプローブを利用したスクリーニングにより、ヒト由来の新規なGタンパク質共役型レセプタータンパク質をコードするcDNAを単離することに成功した。これらGタンパク質共役型レセプタータンパク質を利用することにより、リガンドのスクリーニングやレセプターからのシグナル伝達を調節しうる医薬品候補化合物のスクリーニングを行うことが可能である。

【選択図】 なし

出願人履歴情報

識別番号 [000005072]

1. 変更年月日 1990年 8月 7日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都中央区日本橋本町2丁目2番3号  
氏 名 萬有製薬株式会社



Creation date: 08-12-2003

Indexing Officer: PBELL2 - PORTIA BELL

Team: OIPEBackFileIndexing

Dossier: 09963766

Legal Date: 10-29-2001

No.	Doccode	Number of pages
1	CTMS	2

Total number of pages: 2

Remarks:

Order of re-scan issued on .....